

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ ЖУРНАЛ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
ЗАСНОВАНИЙ У 1934 р.
ВИХОДИТЬ ОДИН РАЗ НА ДВА МІСЯЦІ

MICROBIOLOGICHNY ZHURNAL

Том 74, № 5, вересень—жовтень, 2012

КИЇВ

З М І С Т

Експериментальні праці

Таширєв А.Б., Романовская В.А., Рокитко П.В., Матвеева Н.А., Шилин С.О., Таширєва А.А. Синтез меланиновых пигментов антарктическими чёрными дрожжами	2
Нидялкова Н.А., Мацелюх Е.В., Варбанец Л. Д. Выделение фибринолитической пептидазы <i>Bacillus thuringiensis</i> ИМВ В-7324	9
Грицай Р.В., Броварская О.С., Житкевич Н.В., Варбанец Л.Д. Серологическая характеристика липополисахаридов <i>Ralstonia solanacearum</i>	16
Авдеева Л.В., Осадчая Л.В., Хархота М.А. Влияние лактата и лактулозы на адгезивные свойства пробиотических штаммов <i>Bacillus subtilis</i>	22
Громозова О.М., Качур Т.Л., Войчук С.И., Рязанова Л.П., Кулаковская Т.В. Новые аспекты плейотропного действия генов, кодирующих экзополифосфатазы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Poltavska O.A., Kovalenko N.K. Antimicrobial Activity of Bifidobacterial Bacteriocin-Like Substances	32
Смирнова Г.Ф., Подгорский В.С., Мучник Ф.В. Восстановление хлоратов <i>Acinetobacter thermoanaerobius</i> C-1 в присутствии некоторых тяжелых металлов	43
Погорелова В.В., Бега З.Т., Курдиш И.К. Взаимоотношение инфузорий с азотобактером и их влияние на растения	48
Сафронова Л.А., Зелена Л.Б., Ключко В.В., Авдеева Л.В., Рева О.М. Підгорський В.С. Гено- та фенотипна характеристика штамів бацил - компонентів препарату ендоспорин	55
Matselyukh B., Mohammadipanah F., Laatsch H., Rohr J., Efremenkova O., Khilya V. Purification and Structure Elucidation of the By-Product of New Regulator of Antibiotic Production and Differentiation of <i>Streptomyces</i>	66
Рой А.А., Пасичник Л.А., Церковняк Л.С., Ходос С.Ф., Курдиш И.К. Влияние бактерий рода <i>Bacillus</i> на возбудителя бактериального рака томатов	74
Панченко Л.П., Коробкова Е.С. Активность фенилаланин-аммиак-лиазы в каллусных культурах сахарной свеклы, инфицированных ахолеплазмой	81
Лаврінчук В. Я., Голембіовська С. Л., Мацелюх Б. П. Дія пероксиду водню на мутанти <i>Streptomyces globisporus</i> 1912 з різною каротинсинтезуючою активністю	87
Самойлов А. М., Жмурко В.В. Динаміка чисельності діазототрофів у кореневій зоні ізогенних за генами ліній пшениці	92
Burova L.M., Korneichuk E.P., Kushkina A.I., Toykach F.I. Plasmid Profile, Colicinogeny and Phage Sensitivity as Indicators of the Dynamics of <i>Escherichia coli</i> Populations in the Human Gut	99
Shcherbatenko I. S. Graphical Visualization of the Biologically Significant Segments in the Sequence Sets of the Relative Plant Viruses	108
Babenko L. P., Spivak N.Y., Lazarenko L.N. The Effect of Lacto- and Bifidobacteria Compositions on the Vaginal Microflora in Cases of Intravaginal Staphylococcosis	116

Ювілеї і дати

Надежда Константиновна Коваленко. К 75-летию со дня рождения	126
Іван Кирилович Курдиш. До 70-річчя з дня народження	128

А.М. Самойлов, В.В. Жмурко

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

ДИНАМІКА ЧИСЕЛЬНОСТІ ДІАЗОТРОФІВ У КОРЕНЕВІЙ ЗОНІ ІЗОГЕННИХ ЗА ГЕНАМИ VRN ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ

У польовому досліді визначали зміну чисельності діазотрофів та нітрогеназної активності у кореневій зоні ізогенних моногенодомінантних за генами *Vrn* ліній пшениці впродовж онтогенезу від фази кущіння до фази колосіння. Чисельність діазотрофів та активність нітрогенази в онтогенезі зростали у всіх ліній незалежно від їх генотипу. У озимого сорту, рецесивного за всіма локусами *Vrn*, який не переходив до колосіння, зазначені показники були нижчими, ніж у лінії ярого типу розвитку – *Vrn-A1*, *Vrn-B1* та *Vrn-D1*. Серед ярих ліній більшість показників були нижчими у рослин ліній *Vrn-B1*, які значно пізніше переходили у фазу колосіння, ніж ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1*. Зроблено припущення, що відмінності за інтенсивністю азотфіксації та чисельністю діазотрофів у ризосфері пшениці різних ліній пов'язані зі станом локусів генів *Vrn* – домінантним чи/або рецесивним. Вірогідно, що вони, опосередковано, через зміну інтенсивності метаболічних процесів у ліній, впливають на склад та інтенсивність корневих виділень, що обумовлює різний рівень асоціативної азотфіксації у досліджуваних ліній.

Ключові слова: асоціативна азотфіксація, ізогенні лінії *Triticum aestivum* L., діазотрофи, кореневі ексудати, локуси *Vrn*.

Біологічна азотфіксація – основний природний шлях перетворення азоту атмосфери у метаболічно активну форму і надходження його до наземних і водних екосистем. За сучасними уявленнями фіксація молекулярного азоту з високою інтенсивністю відбувається в ризосфері більшості рослин [3, 8]. Провідну роль в агроценозах відіграє симбіотична азотфіксація, активність та продуктивність якої значно вища за інші види фіксації азоту [3]. Однак, асоціативна азотфіксація у злаків, зокрема пшениці, має не менш важливе значення, оскільки діазотрофи (яких відносять до PGPR чи PGPB – plant growth promoting (rhizo)bacteria) в асоціації забезпечують не тільки надходження азоту, але й продукують рістстимулюючі речовини, змінюють проникність клітин кореня, сприяють мінеральному живленню рослин, пригнічують розвиток фітопатогенних мікроорганізмів і загалом позитивно впливають на ріст та розвиток рослин [3, 10]. Тому актуальним є поглиблене вивчення механізмів формування та функціонування азотфіксуючих асоціацій у зв'язку з ростом та розвитком рослин.

Відомо, що характер та інтенсивність фізіолого-біохімічних процесів специфічні для сортів та гібридів сільськогосподарських культур, що пов'язано з особливістю їх генотипів. Це дає підставу припустити, що й перебіг асоціативної азотфіксації залежить від генотипу сорту чи гібриду. Однак для поглиблення уявлень про роль генотипу рослин у функціонуванні азотфіксуючого комплексу важливі дані про те, які саме гени безпосередньо чи/або опосередковано впливають на процес асоціативної азотфіксації. З'ясування цього питання можливе з використанням ізогенних ліній.

Так, у ізогенних ліній пшениці, які несуть гени стійкості до захворювань (*Lr-TR*, *Pm-4b*), а також гени короткостеблості (*Rht3*, *Rht1* + *Rht2*) встановлені істотні відмінності активності процесу асоціативної азотфіксації (АА). При цьому показана специфічність у прояві ефектів конкретних генів короткостеблості й стійкості на формування асоціації, чисельність діазотрофів і нітрогеназну активність [4].

Для встановлення залежності асоціативної азотфіксації в онтогенезі пшениці від конкретного генотипу найбільш адекватними модельними об'єктами можуть бути ізогенні за генами *Vrn* лінії, у яких окремі їх локуси чітко детермінують темпи розвитку (тривалість фази сході-колосіння) [6]. Створені у генофоні певного сорту, такі лінії різняться лише за станом конкретних локусів цих генів, що дає можливість виокремити їх ефекти на процес азотфіксації.

Метою наших досліджень було з'ясування ефектів генів *Vrn* на динаміку асоціативної азотфіксації та чисельності діазотрофів впродовж онтогенезу рослин ізогенних за цими генами ліній м'якої пшениці.

Матеріали і методи. В роботі використані ізогенні моногенодомінантні за локусами *Vrn-A1*, *Vrn-B1* та *Vrn-D1* лінії м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), створені в генофоні озимого сорту Миронівська 808. Всі лінії мають один з генів локусів *Vrn* у домінантному стані і ярий тип розвитку та не потребують яровизації для переходу до колосіння. У озимого сорту всі гени локусів *Vrn* рецесивні, тому без яровизації він не переходить до колосіння в рік весінньої сівби [6]. Ізогенні лінії для досліджень отримані з колекції відділу генетики Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, м. Одеса.

Польові досліді проводили у 2008-2009 рр. на експериментальній ділянці кафедри фізіології та біохімії рослин Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, яка знаходиться на території ботанічного саду університету (м. Харків). Ґрунт – чорнозем опідзолений важко суглинковий. Агротехніка загальноприйнята для ранніх польових культур в зоні східного Лісостепу України. Бактеріальні препарати під пшеницю не вносили. Сівбу проводили в оптимальні строки – перша-друга декада квітня.

Рослини вирощували на ділянках 1 м², кожну лінію у триразовій повторності. Для мікробіологічних досліджень зразки коренів з ґрунтом відбирали за загальноприйнятою методикою у фазах кушіння, виходу в трубку та колосіння-цвітіння ярих ліній. Зразки коренів рослин озимого сорту, який кущився впродовж вегетації, відбирали одночасно зі зразками ярих ліній у вказаних фазах їх розвитку. Одночасно вимірювали температуру та вологість ґрунту на глибині 10-15 і 20-25 см [2]. Підготовку коренів для аналізу проводили методом послідовного відмивання за Красільниковим в модифікації Теппер [7]. Чисельності азотфіксуючих бактерій визначали за загальноприйнятими методами: симбіотрофні асоціативні бактерії підраховували методом граничних розведень на рідкому глюкозо-автолізатному середовищі Федорова в модифікації Калінінської [7], олігонітрофіли та азотобактер – на твердому поживному середовищі Ешбі з манітолом [2]. Чисельність азоспірил підраховували на середовищах Доберейнер та Касераса з конго-червоним [13]. На твердих елективних середовищах підраховували загальне число колонієутворюючих одиниць (КУО) та окремо число колоній, які за культурально-морфологічними ознаками відповідають *Azospirillum spp.* та *Azotobacter spp.* [2,13,15]. Найбільш ймовірне число клітин мікроорганізмів на рідких та напіврідких середовищах підраховували за таблицями Мак-Креді [7]. Чисельність мікроорганізмів виражали у розрахунку на 1 г повітряносухих коренів чи ґрунту для ризоплани та ризосфери відповідно.

Нітрогеназну активність (НА) невідмитих коренів рослин визначали ацетиленовим методом за кількістю відновленого ацетилену до етилену [2,14]. Свіжовідібрані корені за необхідності зволожували та вміщували у флакони об'ємом 200 мл зі щільними гумовими пробками і фіксаторами. Вводили 10 % ацетилену за об'ємом та інкубували зразки 1 годину. Відбирали 5 мл газової фази інкубаційного середовища й консервували у герметичних флаконах із насиченим розчином хлориду натрію. Кількість утвореного етилену визначали на газових хроматографах «Цвет-500»Ю, мод. 530 (Інститут монокристалів НАН України, м. Харків) та Agilent Technologies 6850 (Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, м. Київ).

Статистичну обробку проводили методом дисперсійного аналізу з використанням програми STATISTICA 6.0. В роботі представлені середні дані 2008 і 2009 років, оскільки закономірності досліджуваних процесів у обидва роки були подібними.

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів визначення чисельності діазотрофів виявив певні загальні закономірності у її зміні в роки різні за погодними умовами та впродовж вегетації рослин. Так, вегетаційний період 2009 року був значно посушливіший, ніж 2008 року, що суттєво вплинуло на висіваємість мікроорганізмів та їх активність. Проте у обидва роки досліджень проявилися загальні закономірності у функціонуванні азотфіксуючої асоціації, які не залежали від генотипу ліній за генами *Vrn*.

Чисельність олігонітрофілів на середовищі Ешбі, діазотрофів на середовищі Касераса, симбіотичних асоціативних азотфіксуючих бактерій на середовищі Федорова-Калінінської та азоспірил на середовищі Доберейнер у ліній ярого типу розвитку, незалежно від генотипу за генами *Vrn*, та озимого сорту у досліджуваний період зростали як у ризоплані, так і у ризосфері у обидва роки досліджень, нітрогеназна активність у кореневій зоні також зростала. На нашу думку, це може бути пов'язано з тим, що з ростом рослин збільшується рівень ко-

рених виділень, які забезпечують зростання активності процесу асоціативної азотфіксації [5,11].

Крім того нами виявлено, що загальна чисельність діазотрофів у ризоплані була значно вищою, ніж у ризосфері у всіх досліджуваних ліній, незалежно від їх генотипу за генами *Vrn* у обидва роки досліджень. Чисельність діазотрофів та азоспірил (табл. 1-3), а також нітрогеназна активність (табл. 4) у озимого сорту, який несе всі локуси *Vrn* у рецесивному стані, у всі періоди визначень були найнижчими, порівняно до показників ліній ярого типу розвитку. На нашу думку, у рослин озимого сорту пригнічені фізіолого-біохімічні процеси за весінної сівби [1,9], і, вірогідно, це є причиною найнижчої інтенсивності корених виділень. Виключення становив показник чисельності азотобактера у ризосфері рослин лише у одному випадку, коли у фазі кушіння у озимого сорту він був вищим, ніж у ярих ліній (табл. 1).

Разом із тим, нами встановлені відмінності за показниками формування асоціації та нітрогеназною активністю між досліджуваними лініями залежно від генотипу за генами *Vrn*. У ризосфері ліній ярого типу розвитку кількість КУО олігонітрофілів у всіх досліджуваних фазах розвитку майже не відрізнялась. Чисельність азотобактера у ризосфері всіх ярих ліній під час кушіння була однаковою. У фазі виходу в трубку у лінії *Vrn-D1* вона була найвищою, а у період колосіння цей показник був найвищим у лінії *Vrn-A1*, в той час, як ліній *Vrn-B1* та *Vrn-D1* за цим показником не відрізнялися (див. табл. 1).

Таблиця 1

Чисельність бактерій олігонітрофілів у ризосфері та ризоплані різних ліній пшениці

Генотип лінії	Олігонітрофіли**			Азотобактер**		
	Фази розвитку ярих ліній					
	кущіння	вихід в трубку	колосіння	кущіння	вихід в трубку	колосіння
Ризосфера, млн. КУО / г сухого ґрунту						
<i>Vrn-A1</i>	5,40	17,16	53,23	1,29	11,30	26,08
<i>Vrn-B1</i>	5,00	15,00	50,00	1,23	11,34	24,00
<i>Vrn-D1</i>	5,60	17,60	50,35	1,28	12,21	24,82
Озимий сорт*	4,30	10,85	16,08	1,86	8,43	14,28
НІР ₀₅	0,50	1,83	3,80	0,13	0,39	1,51
Ризоплана, млн. КУО / г сухих коренів						
<i>Vrn-A1</i>	131,33	244,18	485,23	50,60	75,00	142,32
<i>Vrn-B1</i>	120,91	200,60	389,55	42,80	42,32	96,50
<i>Vrn-D1</i>	120,35	224,81	500,45	62,40	62,40	136,55
Озимий сорт*	89,17	144,66	163,03	29,10	28,50	40,35
НІР ₀₅	4,23	4,88	6,74	2,86	4,13	4,85

Примітка:

* – тут і далі – всі локуси генів *Vrn* у рецесивному стані;

** – визначення проводили в посівах на агаризованому середовищі Ешбі.

Щодо чисельності олігонітрофілів та азотобактера у ризоплані, то за нею виявлені чіткі відмінності між лініями ярого типу розвитку. Чисельність олігонітрофілів та азотобактера у ризоплані ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1* була істотно вищою, ніж у лінії *Vrn-B1* у фазах виходу в трубку та колосіння, а у лінії *Vrn-A1* ці показники були вищими, ніж у ризоплані лінії *Vrn-B1* – у всіх фазах розвитку (див. табл. 1).

Аналіз отриманих результатів показав також, що частка азотобактера у загальній чисельності олігонітрофілів не залежить від генотипу ліній, але змінюється впродовж онтогенезу (від кушіння до колосіння) по-різному у ризосфері та ризоплані. У фазі кушіння у ризосфері ліній вона становила близько 22,8 – 24,6 % і зростала до 52,4 – 75,6 % у фазі виходу в трубку. Водночас у ризоплані виявлена протилежна динаміка – у фазі кушіння частка азотобактера становила 32,6 – 51,8 %, але знижувалась у фазі колосіння до 24,75 – 29,3 % (табл. 1). Ця закономірність зберігалась з роками, що може свідчити про збільшення різноманітності групи олігонітрофілів на поверхні коренів впродовж онтогенезу, так як на середовищі Ешбі, окрім *Azotobacter spp.* розвиваються й інші бактерії, які здатні використовувати поживні речовини з розчинів низької концентрації та тою або іншою мірою засвоювати молекулярний азот. До них належать, зокрема, представники родів *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Artrobacter* та деякі специфічні види, які широко представлені серед асоціативних азотфіксаторів пшениці [4].

Відомо, що на середовищі Касераса з конго червоним (RC), на відміну від середовища Ешбі, розвиваються бактерії-діазотрофи, зокрема *Azospirillum* spp., які асимілюють органічні кислоти – основний компонент корневих виділень пшениці. Представники азоспірил, поряд із *Rizobium* sp. (застар. *Agrobacterium* sp.) та *Bacillus* sp. є специфічними асоціативними азотфіксаторами пшениці [4], тому визначення чисельності представників цієї групи є важливою складовою характеристики азотфіксуючого комплексу.

Результати досліджень свідчать про високу чисельність азоспірил в ризоплані рослин досліджуваних ліній (табл. 2). Загальна чисельність азотфіксаторів (див. табл. 2) як у ризосфері, так і в ризоплані рослин лінії *Vrn-B1* була нижчою, ніж у ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1* у фазах виходу в трубку та колосіння. Чисельність азоспірил у ризосфері у фазах кушіння та виходу в трубку у всіх ліній ярого типу розвитку була однаковою, а в період колосіння була вищою в ризосфері рослин ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1*, порівняно з цим показником у лінії *Vrn-B1*. У ризоплані лінії *Vrn-A1* показники загальної чисельності діазотрофів та азоспірил у всіх фазах розвитку, а у лінії *Vrn-D1* у фазах виходу у трубку та колосіння, були вищими, ніж у лінії *Vrn-B1* (див. табл. 2).

Таблиця 2

Загальна чисельність діазотрофів та азоспірил в ризосфері та ризоплані різних ліній пшениці

Генотип ліній	Загальна чисельність**			Азоспірили**		
	Фази розвитку ярих ліній					
	кушіння	вихід в трубку	колосіння	кушіння	вихід в трубку	колосіння
Ризосфера, млн. КУО / г сухого ґрунту						
<i>Vrn-A1</i>	5,31	18,95	41,17	0,51	1,40	6,75
<i>Vrn-B1</i>	4,11	12,75	29,81	0,61	1,13	5,59
<i>Vrn-D1</i>	5,05	20,35	41,62	0,47	1,30	7,01
Озимий сорт*	3,42	8,65	9,03	0,29	1,12	2,41
НІР ₀₅	0,60	2,90	4,06	0,20	0,27	0,52
Ризоплана, млн. КУО / г сухих коренів						
<i>Vrn-A1</i>	49,87	79,11	97,25	15,98	23,67	49,09
<i>Vrn-B1</i>	42,23	56,11	77,38	9,94	19,35	40,68
<i>Vrn-D1</i>	45,65	80,35	107,35	11,32	28,87	55,49
Озимий сорт*	45,25	46,85	45,65	11,08	13,47	11,28
НІР ₀₅	5,45	4,67	6,64	3,12	3,48	4,44

Примітка:

** – визначення проводили в посівах на агаризованому середовищі Касераса (RC)

Відомо, що підрахунок найбільш ймовірного числа клітин мікроорганізмів при використанні методу граничних розведень у рідких та напіврідких середовищах дає більш коректні результати щодо чисельності бактерій, особливо в періоди ґрунтової посухи, коли клітини знаходяться в стані матричного стресу, і їх здатність давати колонії на багатих твердих поживних середовищах обмежена [2]. Враховуючи це, ми використали рідкі середовища Федорова-Калінінської та Доберейнер.

Результати показали, що на середовищі Федорова-Калінінської у ризосфері чисельність симбіотрофних асоціативних бактерій у фазі кушіння була найвищою у лінії *Vrn-D1* та однаковою у ліній *Vrn-A1* та *Vrn-B1*, у фазі виходу в трубку – у лінії *Vrn-A1*, але однаковою у ліній *Vrn-B1* та *Vrn-D1*. У фазі колосіння чисельність цієї групи бактерій у ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1* була істотно вища, ніж у лінії *Vrn-B1* (табл. 3). На цьому середовищі у ризоплані, на відміну від ризосфери, між лініями проявилися значні відмінності за чисельністю симбіотрофних асоціативних бактерій: у фазах виходу в трубку та колосіння у ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1* вона була істотно вищою, ніж у лінії *Vrn-B1* (див. табл. 3).

На середовищі Доберейнер показники чисельності азоспірил були значно вищі, ніж число КУО на твердому поживному середовищі Касераса (див. табл. 3). У фазах кушіння та виходу в трубку у ризосфері не виявлена відмінність за чисельністю азоспірил між досліджуваними лініями. Проте у фазі колосіння у ризосфері цей показник був найнижчим у лінії *Vrn-B1*. У ризоплані на середовищі Доберейнер чисельність азоспірил у всіх досліджуваних фазах онтогенезу у ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1* була вищою, ніж у лінії *Vrn-B1* (табл. 3).

Таблиця 3

Загальна чисельність симбіотрофних асоціативних бактерій та азоспірил в ризосфері та ризоплані різних ліній пшениці

Генотип ліній	Симбіотрофні асоціативні бактерії**			Азоспірили***		
	Фази розвитку ярих ліній					
	кущіння	вихід в трубку	колосіння	кущіння	вихід в трубку	колосіння
Ризосфера, млн. клітин / г сухого ґрунту						
<i>Vrn-A1</i>	8,30	20,18	39,91	1,71	8,47	11,42
<i>Vrn-B1</i>	8,10	16,13	27,92	1,82	7,00	9,52
<i>Vrn-D1</i>	10,35	16,45	41,75	1,87	6,48	12,32
Озимий сорт*	5,69	9,71	10,03	1,78	4,86	6,22
НІР ₀₅	1,20	1,44	3,60	0,24	1,11	1,16
Ризоплана, млн. клітин / г сухих коренів						
<i>Vrn-A1</i>	40,45	80,73	143,24	34,90	61,98	80,89
<i>Vrn-B1</i>	37,81	52,91	108,36	21,66	47,89	64,58
<i>Vrn-D1</i>	42,48	70,53	146,23	24,07	52,87	93,64
Озимий сорт*	29,81	35,15	42,23	25,43	36,57	47,75
НІР ₀₅	2,64	3,20	3,87	1,10	3,61	4,14

Примітка:

** – визначення проводили на рідкому середовищі Федорова-Калінінської

*** – визначення проводили на рідкому середовищі Доберейнер

Визначення нітрогеназної активності показало, що її рівень, як і чисельність основних груп діазотрофів, зростає в онтогенезі пшениці й сягає свого максимуму у фазі колосіння-цвітіння (табл. 4), що збігається з літературними даними [8]. У фазі кущіння, коли ризомікроценоз тільки-но формується, несприятливі кліматичні умови найбільш негативно впливають на інтенсивність асоціативної азотфіксації. Так, у 2009 році за несприятливих погодних умов у квітні рослини затримувалися у розвитку, що значно знизило активність фіксації азоту, порівняно до неї за більш сприятливих умов 2008 року, бо активність азотфіксації цього року була в 2,7 – 7,2 разів вища, ніж у 2009. Вірогідно, що це одна з причин, яка не дозволила виявити відмінності між лініями за нітрогеназною активністю на ранніх фазах розвитку. Тим не менше, визначення нітрогеназної активності у фазах виходу в трубку та колосіння показало, що вона в кореневій зоні ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1* у більшості випадків була істотно вища, ніж у лінії *Vrn-B1* (табл. 4).

Таблиця 4

Нітрогеназна активність невідмитих коренів рослин ізогенних за генами *Vrn* ліній пшениці, нмоль C_2H_4 / г сухих коренів за годину

Генотип лінії	Фази розвитку ярих ліній					
	кущіння		вихід в трубку		колосіння	
	2008	2009	2008	2009	2008	2009
<i>Vrn-A1</i>	810,21	112,47	890,35	735,42	2626,05	1674,41
<i>Vrn-B1</i>	580,04	111,59	600,13	390,86	1967,77	1300,57
<i>Vrn-D1</i>	430,38	159,64	770,10	1114,49	3397,40	2960,33
Озимий сорт*	350,95	78,12	540,23	339,58	610,14	545,13
НІР ₀₅	47,07	15,09	56,92	59,09	87,74	102,07

Зіставлення динаміки чисельності діазотрофів та активності нітрогенази впродовж досліджуваних фаз онтогенезу показало, що між ними завжди проявляється тісний позитивний зв'язок. Так, при значному зростанні чисельності діазотрофів нітрогеназна активність зростає незначно, або ж при деякому збільшенні числа азотфіксаторів у кореневій зоні вона підвищується істотно. Вірогідно, що такий характер зв'язку між чисельністю компонентів асоціації та нітрогеназною активністю зумовлений не тільки чисельністю азотфіксаторів, а ефективністю функціонування асоціації загалом.

Таким чином, одержані результати свідчать, що, незалежно від генотипу ліній, впродовж досліджуваного періоду онтогенезу зростає чисельність компонентів азотфіксуючої асоціації та нітрогеназна активність. Це, на нашу думку, пов'язано з посиленням фізіолого-біохімічних процесів у рослин впродовж онтогенезу, в тому числі і зростанням інтенсивності кореневих виділень [5,11]. Тим не менше, за динамікою чисельності діазотрофів та азоспірил у

ризосфері та ризоплані досліджувані лінії ярого типу розвитку, які несуть різні локуси генів *Vrn* у домінантному стані, та озимий сорт – повний рецесив за локусами *Vrn*, істотно відрізняються між собою.

У рослин озимого сорту (повний рецесив за локусами *Vrn*) всі показники асоціативної азотфіксації істотно нижчі, ніж у ліній ярого типу розвитку, створених у його генофоні. Серед ярих ліній найнижчі показники (за окремими випадками) характерні для лінії *Vrn-B1*.

Отримані дані дають підставу вважати, що встановлені відмінності між лініями можуть бути пов'язані з їх генотипом за генами *Vrn*. Однією з вагомих причин, що обумовлюють цю відмінність, може бути особливість розвитку досліджуваних ізогенних ліній.

Факт прискореного розвитку моногенодомінантних ліній із генотипами *Vrn-A1* та *Vrn-D1* порівняно з розвитком лінії *Vrn-B1* чітко встановлений багатьма дослідженнями [6], у тому числі й нашими [1,5]. Згідно з нашими попередніми даними [1], моногенодомінантні лінії різняться за накопиченням вуглеводів в листках. Впродовж світлового періоду у лінії *Vrn-B1* їх накопичується більше, ніж у ліній, що швидко розвиваються – *Vrn-A1* та *Vrn-D1*. На нашу думку, це може бути пов'язано не стільки зі швидкістю утворення, скільки з повільнішим відтоком до апікальних меристем та інших акцепторних зон, причому краще забезпечення точок росту асимілятами зумовлює прискорення морфогенетичних процесів [9]. Очевидно, у ліній *Vrn-A1* та *Vrn-D1* ці процеси відбуваються інтенсивніше, що зумовлює прискорення темпів розвитку рослин.

Асоціації діазотрофів з рослинами формуються й функціонують за рахунок метаболічної активності кореневої системи: корневих виділень та продуктів життєдіяльності самих азотфіксаторів й інших ризосферних мікроорганізмів [11]. Показано, що накопичення бактеріальної біомаси в ризосфері рослин злаків є показником кількості корневих екзометаболітів, а активність мікроорганізмів залежить від швидкості відтоку фотосинтатів [11,12]. У попередніх дослідженнях нами показано, що ізогенні лінії різняться між собою за вмістом вуглеводів, органічних та амінокислот в корневих виділеннях при культивуванні рослин на рідкому поживному середовищі в умовах факторостатного експерименту [5].

Таким чином, на основі одержаних результатів та літературних даних можна зробити припущення, що різниця у функціонуванні азотфіксуючої асоціації пов'язана з темпами розвитку досліджуваних ліній пшениці, які детерміновані локусами генів *Vrn*. Одним із можливих механізмів цього зв'язку може бути різна інтенсивність процесів накопичення фотосинтатів у листках, їх перетворення та відтоку до атрагуючих центрів, зокрема до кореневої системи, що зумовлено генотипами цих ліній [1,9]. Вірогідно, це призводить до різного рівня інтенсивності корневих виділень, що обумовлює різний рівень чисельності мікроорганізмів у кореневій зоні пшениці та їх активності за сприятливих умов.

Автори висловлюють подяку академіку УААН А.Ф. Стельмаху і д-ру біол. наук В.І. Файту за надані для досліджень ізогенні лінії пшениці, а також д-ру біол. наук С.Я. Коцю за методичну допомогу в проведенні досліджень.

А.М. Самойлов, В.В. Жмурко

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ ДИАЗОТРОФОВ В КОРНЕВОЙ ЗОНЕ ИЗОГЕННЫХ ПО ГЕНАМ VRN ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ

Резюме

В полевом опыте определяли изменение численности диазотрофов и нитрогеназной активности в корневой зоне изогенных моногенодоминантных линий по генам *Vrn* линий пшеницы в течение онтогенеза от фазы кущения до колошения. Численность диазотрофов и активность нитрогеназы в течение исследуемого периода возрастали у всех линий независимо от их генотипа. У озимого сорта, рецессивного по всем локусам *Vrn*, который не переходил к колошению, указанные показатели были ниже, чем у линий ярового типа развития – *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*. Среди яровых линий большинство показателей были ниже у растений линии *Vrn-B1*, которые значительно позже переходили в фазу колошения, чем линии *Vrn-A1* и *Vrn-D1*. Высказано предположение, что отличия по интенсивности азотфиксации и численности диазотрофов в ризосфере пшеницы разных линий связаны с состоянием генов *Vrn* – доминантным и/или рецессивным. Вероятно, что они, опосредованно, через изменение интенсивности метаболитических процессов у линий, влияют на состав корневых выделений, что обуславливает разный уровень ассоциативной азотфиксации у исследуемых линий.

К л ю ч е в ы е с л о в а : ассоциативная азотфиксация, изогенные линии *Triticum aestivum* L., диазотрофы, корневые экссудаты, локусы *Vrn*.

A.M. Samoilov, V.V. Zhmurko

V.N. Karazin Kharkov National University

DYNAMICS OF DIAZOTROPHIC BACTERIA NUMBER IN THE ROOT ZONE OF WHEAT VRN LINES ISOGENIC BY GENES

S u m m a r y

The number of diazotrophic bacteria and nitrogenase activity in the root zone of isogenic monogene-dominant *Vrn* lines were measured in the field experiments throughout their vegetation from tillering to heading. The total number of diazotrophic bacteria and nitrogenase activity in the root zone of these lines during this period were increased irrespective of their genotypes. The above indices of the winter cultivar (*Vrn* loci bottom recessive) were lower than those of the spring lines – *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1*. Plants of *Vrn-B1* line have the lowest indices among the spring lines with the exception of some indices. This line plants flowered later than those of *Vrn-A1* and *Vrn-D1* lines. We hypothesized the differences between plants of these lines as to nitrogen fixation activity and the number of diazotrophic bacteria are mediately determined by *Vrn* loci through their effects on metabolism intensity and assimilate reflux in the form of root exudates, therefore the total number of diazotrophic bacteria and nitrogenase activity increases.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s : associative nitrogen fixation, wheat isogenic lines, diazotrophs, rates of development of plants, *Vrn* loci.

The a u t h o r ' s a d d r e s s : *Zhmurko V.V.*, V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov, 61077, Ukraine.

1. *Жмурко В.В., Авксентьева О.А.* Некоторые физиолого-биохимические аспекты генетического контроля озимости и фотопериодической реакции растений // *Достижения і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. праць.* – Киев: Логос, 2007. – С. 28–33.
2. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* / Под. ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. – 304 с.
3. *Патика В.П., Волкогон В.В., Надкернична О.В.* та ін. Біологічна азотфіксація: вчора, сьогодні, завтра // *Фізіологія рослин на межі тисячоліть.* – 2002. – 1. – С. 212–226.
4. *Родынюк И.С.* Ассоциативная азотфиксация в ризоценозе изогенных иммунных и короткостебельных линий яровой мягкой пшеницы // *С.-х. биология.* – Сер. Биология растений. – 1991. – №5. – С. 88–95.
5. *Самойлов А.М., Авксентьева О.А., Жмурко В.В.* Эндо- и экзометаболиты корней линий озимой пшеницы, изогенных по генам *Vrn*, и их влияние на хемотаксический ответ *Azospirillum brasilense* // *Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку: у 2 т.* / НАН України, Ін-т фізіол. рослин та генетики; Укр. тов-во фізіол. рослин. – К.: Логос, 2009. – Т. 1. – С. 471–479.
6. *Стельмах А.Ф.* Генетика темпів розвитку пшениць (внесок Селекційно-генетичного інституту за 30 років) // *Тр. по фундаментальній і прикладній генетиці (к 100-летньому ювілею генетики).* – Харьков: Штрих, 2001. – С. 89–109.
7. *Теттер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии. – М.: Агропромиздат, 1987. – 239 с.
8. *Умаров М.М.* Ассоциативная азотфиксация. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. – 132 с.
9. *Цыбулько В.С., Жмурко В.В., Гридин Н.Н.* Метаболическая теория озимости растений. – Харьков: Ин-т растениеводства им. В.Я. Юрьева, 2000. – 140 с.
10. *Bashan Y.G., Hogue L.E.* *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances // *Can. J. Microbiol. / Rev. Can. Microbiol.* – 2004. – 50, N 8. – P. 2599–2606.
11. *Beck S.M., Gilmour C.M.* Role of wheat root exudates in associative nitrogen fixation // *Soil Biol. Biochem.* – 1983. – 15, N 1. – P.33–38.
12. *Bennet R., Lynch J.* Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereals plants // *J. Gen. Microbiol.* – 1981. – 125. – P. 95–102.
13. *Caceres E.A.R.* Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1982. – 44, N 4. – P. 990–991.
14. *Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C.* The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation // *Plant Physiol.* – 1968. – 43, N 8. – P. 1185–1207.
15. *Wright S.F., Weaver R.W.* Enumeration and identification of nitrogen-fixing bacteria from forage grass roots // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1981. – 42, N 1. – P. 97–101.

Отримано 11.05.2011